

Optimasi Metode Cryotherapy untuk Mengeliminasi Virus pada Tunas Kentang *In Vitro* (Optimization of Cryotherapy Method to Eliminate Virus on *In Vitro* Potato Shoot Tips)

Ida Ayu Astarini¹⁾, Angel Chappell²⁾, Douglas Scheuring²⁾, Sean Michael Thompson²⁾,
dan Julian Creighton Miller Jr.²⁾

¹⁾Program Studi Biologi FMIPA, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali, Indonesia 80364

²⁾Texas A&M University, Department of Horticultural Sciences, College Station, Texas, USA

E-mail: idaastarini@yahoo.com, iaastarini@unud.ac.id

Naskah diterima tanggal 11 November 2015 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 5 April 2016

ABSTRAK. Penggunaan benih kentang generasi awal dan bebas virus merupakan kunci keberhasilan produksi kentang berkualitas. Cryotherapy (perendaman dalam nitrogen cair) merupakan teknik terbaru untuk mengeliminasi virus pada benih kentang. Salah satu kendala dalam penerapan teknologi cryotherapy ialah tingkat daya hidup eksplan yang masih rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas teknik enkapsulasi-dehidrasi untuk mendapatkan tunas yang sehat setelah perendaman dalam nitrogen cair. Ujung tunas *in vitro* ukuran 2–3 mm dari empat genotipe kentang di prakultur selama 3 hari secara bertahap pada media MS dengan penambahan gula 0,25 M, 0,5 M, dan 0,75 M. Kemudian tunas dienkapsulasi, didehidrasi selama 5 jam, lalu direndam dalam nitrogen cair selama 60 menit lalu dihangatkan kembali dalam *waterbath* selama 3 menit. Tunas dalam kapsul kemudian dikulturkan pada media MS +30 g/l sukrosa + 8 g/l agar + 0,4 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ untuk pemulihan, lalu dipelihara di ruang kultur dengan suhu 24°C. Daya hidup ujung tunas diamati pada minggu ke-8 dengan menggunakan kriteria skoring sebagai berikut: (1) pemutihan jaringan dan tidak ada respons pertumbuhan, (2) kalus mencokelat, (3) kalus hijau, (4) tumbuh tunas, dan (5) planlet sehat. Hasil penelitian menunjukkan daya hidup ujung tunas bervariasi antargenotipe. Skor daya hidup berkisar 1–2 (frekuensi 2–10) pada perlakuan nitrogen cair, yang menunjukkan tidak ada respons pertumbuhan tunas, beberapa memperlihatkan pertumbuhan kalus. Tunas pada perlakuan kontrol (tanpa perendaman dalam nitrogen cair) menunjukkan skor daya hidup 5 (frekuensi 1–7), di mana ujung tunas mampu beregenerasi menjadi planlet.

Kata kunci: Cryopreservation; *Solanum tuberosum*; Kultur jaringan tanaman; Eliminasi virus

ABSTRACT. Virus-free, early generation seed is a key in the production of high quality potatoes. Cryotherapy (exposure to liquid nitrogen) is a new and promising method of virus elimination. One bottleneck in cryotherapy method is survival of the explants after treatment with liquid nitrogen. This study investigated the effectiveness of encapsulation-dehydration method to obtain survival explants. Shoot tips were precultured for 3 days in MS media with sucrose addition of 0.25 M, 0.5 M and 0.75 M. Shoot tips were then encapsulate, dehydrate for 5 hours, expose to liquid nitrogen for 60 minutes and rewarm in *waterbath* for 3 minutes. Beads with shoot tips were then cultured in MS media + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar + 0.4 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ for recovery, and placed in 24°C culture room. Shoot tip survival was assessed at 8 weeks using the following scoring criteria: (1) tissue bleaching and no growth response, (2) brown callus, (3) green callus, (4) shoot growth, and (5) plantlet establishment. Survival was varied among genotypes. Survival scored between 1–2 (frequency 2–10) on liquid nitrogen treatment, showing shoot tips are mostly has no growth response, only some callus growth. Shoot tips on control treatment (without exposure in liquid nitrogen) shows survival scored 5 (frequency 1–7), i.e. shoot tips able to regenerate into plantlets.

Keywords: Cryopreservation; *Solanum tuberosum*; Plant tissue culture; Virus elimination

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan tanaman pangan yang dikonsumsi tertinggi keempat di dunia setelah beras, gandum, dan jagung. Penyakit yang disebabkan oleh virus merupakan salah satu permasalahan dalam peningkatan produktivitas dan kualitas benih kentang. *Potato leaf roll virus* (PLRV) dan *potato virus Y* (PVY) merupakan penyakit yang paling sering menyerang pertanaman kentang (Brunt 2001). Penyakit yang disebabkan PVY saja dapat mengakibatkan kerugian sampai 30 – 50% (Feng et al. 2013).

Berbagai teknologi telah dikembangkan untuk mengeradikasi virus pada kentang, seperti kultur meristem, terapi panas, dan terapi panas yang

diikuti dengan kultur meristem (Wang et al. 2014). Pada metode terapi panas, tunas *in vitro* kentang diinkubasi selama 6 minggu, kemudian diuji dengan metode ELISA untuk memastikan tunas *in vitro* telah bebas virus. Apabila virus masih terdeteksi maka inkubasi diulang kembali sehingga tunas menjadi bebas virus (Chappell 2014 komunikasi pribadi). Hal ini mengakibatkan terhambatnya penyediaan benih kentang sehat bebas virus.

Metode terbaru untuk eliminasi virus ialah cryotherapy atau terapi dengan suhu ultra dingin (-196°C) dalam nitrogen cair. Menurut Wang et al. (2012) teknik ini memerlukan waktu yang lebih singkat untuk mengeliminasi virus, serta persentase keberhasilan

memperoleh tunas kentang bebas virus lebih tinggi. *Cryotherapy* ujung tunas *in vitro* dilakukan dengan mencelupkan ujung tunas tersebut ke dalam nitrogen cair dalam waktu kurang lebih 1 jam (Feng *et al.* 2013, Wang *et al.* 2012). Keberhasilan teknik *cryotherapy* telah dilaporkan pada berbagai tanaman seperti lili (Yin *et al.* 2014), *raspberry* (Wang & Valkonen 2009), bawang putih (Kim *et al.* 2007), ubi jalar (Wang & Valkonen 2008), dan kentang (Wang *et al.* 2006).

Dalam penerapannya, keberhasilan teknik *cryotherapy* dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti genotipe, praperlakuan terhadap tunas *in vitro* dan metode untuk melindungi tunas *in vitro* sebelum dicelupkan ke dalam nitrogen cair (Wang *et al.* 2006). Beberapa teknik *cryotherapy* telah dijelaskan oleh Wang *et al.* (2014), yaitu enkapsulasi-dehidrasi, enkapsulasi-vitrifikasi, dan droplet vitrifikasi. Pada teknik enkapsulasi-dehidrasi, tunas *in vitro* kentang diselimuti dengan kapsul yang terbuat dari campuran sodium alginat dan kalsium klorida, dan selanjutnya kapsul dikeringkan 2–5 jam sebelum dicelupkan ke dalam nitrogen cair untuk mengeliminasi virus. Pada teknik enkapsulasi-vitrifikasi, kapsul yang telah berisi tunas kentang selanjutnya direndam dalam larutan vitrifikasi sebelum dicelupkan pada nitrogen cair. Pada droplet-vitrifikasi, tunas kentang *in vitro* ditetesi dengan larutan vitrifikasi, dibungkus dengan aluminium foil dan dicelupkan ke dalam nitrogen cair. Vitrifikasi adalah proses solidifikasi yang cepat dari larutan yang memiliki viskositas tinggi, yang terjadi pada saat pendinginan yang sangat cepat, seperti pada pencelupan ke dalam nitrogen cair (Joris 2015). Proses ini dimaksudkan untuk melindungi tunas kentang agar tetap bertahan hidup dan hanya patogen yang tereliminasi selama inkubasi dalam nitrogen cair.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keefektifan metode enkapsulasi-dehidrasi pada empat genotipe kentang. Hipotesis yang dianjurkan ialah didapatkan tunas yang sehat pada keempat genotipe kentang, setelah perlakuan enkapsulasi-dehidrasi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli – September 2014 di Laboratorium Kultur Jaringan, grup riset kentang, School of Horticulture, Texas A&M University, College Station, Texas. Empat genotipe kentang yang telah terinfeksi virus secara alami, digunakan dalam penelitian ini, yaitu ATTX98466-3R/WR, COTX08121-1Ru, ATX07305s-1Y/Y, dan UMTX383-3WRE/Y. Kentang ditanam secara *in*

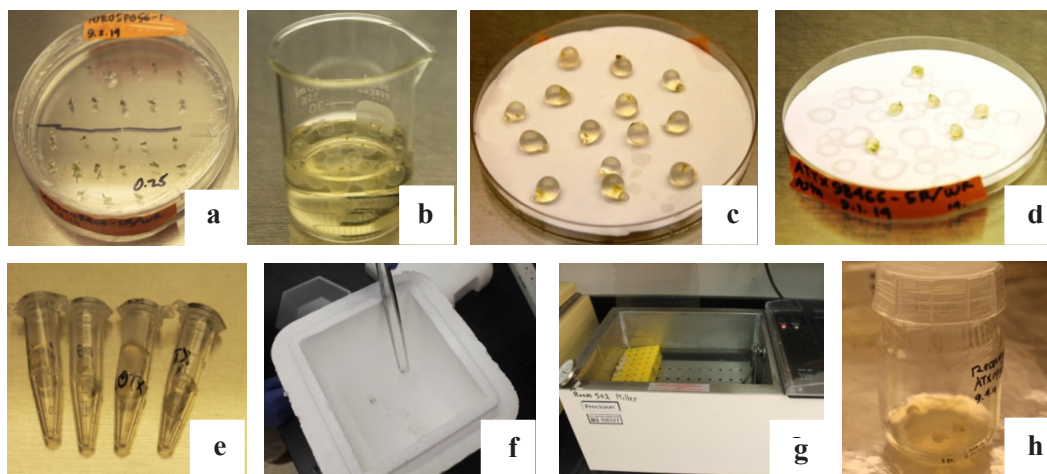
vitro dan dipelihara dalam kultur selama 8 minggu. Keempat genotipe ini dipilih terinfeksi virus yang berbeda sehingga diharapkan memiliki respons yang berbeda terhadap perlakuan *cryotherapy*.

Metode enkapsulasi-dehidrasi yang digunakan dalam penelitian ini mengikuti metode Wang *et al.* (2006) yang telah dimodifikasi. Ujung tunas berukuran 2–3 mm diambil dari kultur *in vitro* tunas kentang dan ditanam pada cawan petri berdiameter 15 cm yang berisi media prakultur. Prakultur dilakukan secara bertahap dengan menggunakan media MS (Murashige & Skoog 1962) dengan penambahan 8 g/l agar dan konsentrasi gula yang berbeda, yaitu 0,25 M, 0,5 M, dan 0,75 M masing-masing 1 hari, selanjutnya diinkubasi dalam ruang dengan suhu 23°C dengan intensitas cahaya $\pm 40 \mu\text{mol/m}^2/\text{detik}$ dan fotoperiode 16 jam/hari (Gambar 1a).

Selanjutnya tunas dienkapsulasi menjadi kapsul-kapsul kecil dengan merendamnya dalam larutan *sodium alginate* (0,4 M sukrosa, 2 M glycerol + 2,5% (w/v) *sodium alginate* dalam media MS cair, pH 5,8) selama 5 menit lalu direndam dalam larutan CaCl_2 (media MS cair berisi 0,1 M CaCl_2 , 2 M glycerol + 0,4 M sukrosa, pH 5,8) selama 20 menit hingga kapsul terbentuk sempurna (Gambar 1b, 1c). Kapsul-kapsul tersebut selanjutnya diletakkan di atas kertas Whatman pada cawan petri, lalu didehidrasi dalam *laminar air flow cabinet* selama 5 jam (Gambar 1d). Setelah itu dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf (Gambar 1e) dan direndam dalam nitrogen cair (Gambar 1f). Sebagai kontrol ialah kapsul yang tidak dicelup ke dalam nitrogen cair. Tabung Eppendorf berisi kapsul ujung tunas kemudian dihangatkan kembali dalam *waterbath* suhu 38°C selama 3 menit (Gambar 1g). Selanjutnya ujung tunas yang masih dienkapsulasi ditransfer ke media pemulihan (*recovery medium*) berupa media MS + 30 g/l sukrose + 8 g/l agar + 0,4 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ dan dipelihara pada ruang kultur dengan suhu 24°C dengan intensitas cahaya sekitar $40 \mu\text{mol/m}^2/\text{detik}$ dan fotoperiode 16 jam/hari, selama 4 minggu (Gambar 1h) untuk menginduksi pembelahan sel dan pertumbuhan tunas. Dilanjutkan dengan subkultur pada media yang sama, namun tunas dikeluarkan dari kapsulnya.

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan dua faktor, yaitu genotipe (empat genotipe) dan perendaman pada nitrogen cair (0 dan 60 menit). Tiap kombinasi perlakuan diulang 10 kali. Data dianalisis dengan *analysis of variance* dan jika berbeda nyata diuji lanjut dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% untuk membedakan antar perlakuan.

Variabel yang diamati ialah tunas *in vitro* yang tetap hidup setelah perlakuan. Ujung tunas yang hidup diamati



Gambar 1. Tahapan pada *cryotherapy* ujung tunas kentang dengan teknik enkapsulasi-dehidrasi. (a) ujung tunas ditanam pada media prakultur, (b) pengentalan kapsul berisi tunas dalam larutan *Calcium chloride*, (c) kapsul sebelum didehidrasi, (d) kapsul setelah dehidrasi selama 5 jam, (e) kapsul dimasukkan ke dalam *Eppendorf tube* siap direndam dalam nitrogen cair, (f) *Eppendorf tube* direndam dalam nitrogen cair, (g) *Eppendorf tube* direndam dalam *waterbath* 38°C, dan (h) kapsul pada media pemulihan [Steps on cryotherapy of potato shoot tips using encapsulation-dehydration technique. (a) shoot tips cultured on pre-culture medium, (b) encapsulation of shoot tips on Calcium Chloride solution, (c) capsules before dehydration, (d) capsules after dehydration for 5 hours, (e) capsules placed in Eppendorf tubes ready for dipping in liquid nitrogen, (f) Eppendorf tubes dipped in liquid nitrogen, (g) Eppendorf dipped 38°C waterbath, and (h) capsules on recovery medium]

pada minggu ke-8 dengan menggunakan kriteria skoring sebagai berikut: (1) pemutihan jaringan dan tidak ada respons pertumbuhan, (2) kalus mencokelat, (3) kalus hijau, (4) pertumbuhan tunas, dan (5) planlet sehat. Dicatat frekuensi nilai skor daya hidup tiap perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan tiap genotipe memiliki respons yang berbeda terhadap perlakuan *cryotherapy*. Daya hidup tunas pada perlakuan dengan nitrogen cair sangat rendah, ditunjukkan oleh skor berkisar antara 1 dan 2 pada semua genotipe (Tabel 1). Genotipe UMTX383-3WRE/Y menunjukkan respons terendah, di mana 10 tunas yang dicobakan tidak menunjukkan pertumbuhan, semuanya memutih/pucat (Gambar 3a). Pada genotipe lainnya, 2–4 tunas menunjukkan respons positif berupa penggembungan dan pembentukan kalus, namun kalus mencokelat pada akhir pengamatan.

Pada perlakuan kontrol, skor survival juga bervariasi antargenotipe. Skor terendah pada genotipe UMTX383-3WRE/Y (frekuensi skor 1 sebanyak 6 tunas, Tabel 1 yang menunjukkan sebagian besar tunas menghasilkan kalus yang mencokelat. Genotipe ATTX98466-3R/WR menunjukkan frekuensi skor

tertinggi (sebanyak tujuh tunas pada skor 5) yang berarti sebagian besar eksplan tunas menghasilkan tunas baru (Gambar 3d). Beberapa tunas bahkan menunjukkan pertumbuhan planlet yang sehat (Gambar 2e).

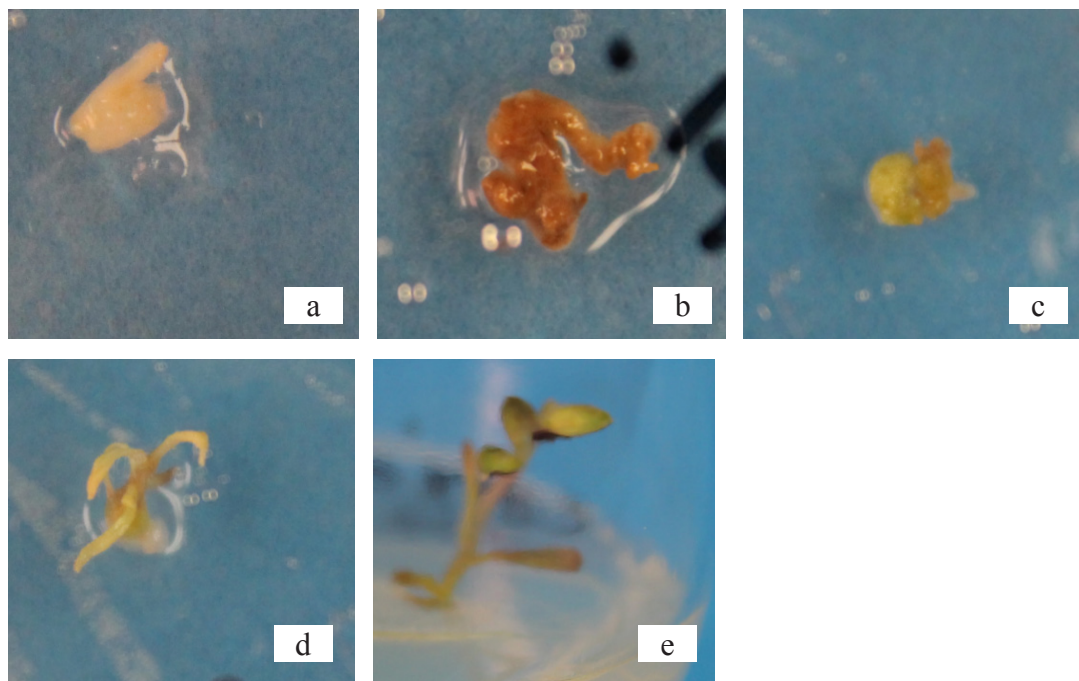
Teknik *cryotherapy* bertujuan untuk mengeliminasi virus pada tanaman. Pada teknik ini, bahan tanaman yang digunakan pada umumnya ialah ujung tunas *in vitro*. Dalam penerapan teknik *cryotherapy*, tunas *in vitro* perlu diberi perlakuan khusus sebelum diekspose dalam nitrogen cair, untuk memastikan ujung tunas dapat bertahan hidup (*survive*) setelah perendaman dalam suhu ultra dingin (-196°C). Berbagai teknik telah dikembangkan untuk melindungi ujung tunas tersebut, salah satunya ialah teknik enkapsulasi-dehidrasi.

Pada teknik enkapsulasi-dehidrasi, ujung tunas di prakultur terlebih dahulu pada media MS dengan konsentrasi gula yang semakin meningkat mulai dari 0,25 M hingga 0,75 M. Hal ini ditujukan untuk meningkatkan kekuatan tunas *in vitro* sehingga dapat bertahan hidup pascaenkapsulasi dan perendaman dalam nitrogen cair.

Tahapan enkapsulasi bertujuan untuk melindungi tunas *in vitro* agar tidak terekspos langsung pada suhu ultra dingin (Kacmarczyk et al. 2011). Dehidrasi kapsul selama 5 jam ditujukan untuk mendapatkan kapsul

Tabel 1. Frekuensi skor pertumbuhan tunas *in vitro* pada empat genotipe kentang, tanpa perlakuan nitrogen cair (kontrol) atau dengan perlakuan nitrogen cair [Scoring frequency of *in vitro* growth of four potato genotypes, without (control) and with liquid nitrogen treatment]

Frekuensi skor (Frequency of score)	Genotipe (Genotype)			
	ATTX98466-3R-WR	COTX08121-IRU (RY)	ATX07305S-1Y/Y	UMTX383-3WRE/Y
Kontrol (Control)				
5	7	4	1	1
4	0	0	1	0
3	0	0	0	0
2	2	6	6	3
1	1	0	1	6
Perendaman pada nitrogen cair (Dipping on liquid nitrogen)				
5	0	0	0	0
4	0	0	0	0
3	0	0	0	0
2	2	4	2	0
1	8	6	8	10



Gambar 2. Skoring pertumbuhan tunas *in vitro* kentang, (a) tunas memutih, (b) kalus mencokelat, (c) kalus menghijau, (d) tunas mulai tumbuh memanjang dan berdaun, dan (e) tunas sehat pada perlakuan kontrol, tanpa pencelupan ke dalam nitrogen cair [Scoring on potato *in vitro* shoot growth, (a) shoot bleach, (b) brown callus, (c) green callus, (d) shoot elongation and produce new leaves, and (e) healthy shoot on control treatment, without dipping in liquid nitrogen]

dengan kadar air yang ideal (20%) bagi tunas *in vitro* sehingga tunas tidak mengalami kerusakan akibat pendinginan (*chilling injury*) selama perendaman dalam nitrogen cair (AlMaarri *et al.* 2012).

Rendahnya tunas *in vitro* yang tetap hidup pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh

beberapa faktor. Faktor pertama, penggunaan media praperlakuan berupa kadar gula yang meningkat dari 0,25 M hingga 0,75 M selama 3 hari pada suhu 18°C, menghasilkan tunas yang kaku dan renyah. Percobaan kondisi tumbuh yang berbeda saat praperlakuan perlu dilakukan, misalnya dengan inkubasi pada suhu

rendah (0°–4°C) untuk memperlambat pertumbuhan tunas kentang sehingga tunas yang dihasilkan lebih keras namun tidak renyah, dan lebih tahan terhadap enkapsulasi dan perendaman dalam nitrogen cair.

Teknik enkapsulasi-dehidrasi belum efektif untuk mendapatkan tunas yang dapat tumbuh sehat. Faktor yang dapat memengaruhi antara lain ialah ukuran ujung tunas yang akan dienkapsulasi dan lama waktu dehidrasi (Wang *et al.* 2006). Dalam penelitian ini digunakan tunas dengan ukuran 2 mm dengan lama waktu dehidrasi selama 5 jam sesuai hasil penelitian terbaik yang dilaporkan oleh Wang *et al.* (2006). Variasi ukuran ujung tunas dan lama waktu dehidrasi perlu dicoba untuk mendapatkan ukuran tunas dan lama waktu dehidrasi yang optimum. Air, merupakan pelarut alami, sangat menentukan persentase hidup setelah bahan tanaman terekspos nitrogen cair (Fuller 2004).

Genotipe kentang dapat pula menjadi faktor penentu keberhasilan teknik *cryotherapy*. Genotipe kentang yang digunakan dalam penelitian ini berbeda dengan genotipe yang digunakan dalam penelitian Wang *et al.* (2006). Ukuran tunas yang akan dienkapsulasi dan lama dehidrasi yang diperlukan mungkin berbeda pada genotipe yang berbeda.

Untuk memastikan kadar air yang tepat yang dapat melindungi tunas selama terekspos nitrogen cair, teknik *cryotherapy* yang berbeda perlu juga dicoba, seperti enkapsulasi-vitrifikasi dan droplet-vitrifikasi (Jianming *et al.* 2012, Wang *et al.* 2014). Enkapsulasi dan vitrifikasi merupakan cara untuk melindungi tunas *in vitro* kentang dari kerusakan akibat suhu yang terlampau dingin di mana dengan pemberian larutan vitrifikasi atau pengkapsulan, diharapkan tunas tidak mengalami kristalisasi (Kacmarczyk *et al.* 2011). Selain *cryotherapy*, teknik lain yang dapat digunakan untuk eliminasi virus kentang ialah *thermotherapy* dan *electrotherapy* (AlMaarri *et al.* 2012).

Pada media pemulihan, digunakan zat pengatur tumbuh (ZPT) BAP dan GA₃. Penggunaan ZPT pada kultur jaringan dimaksudkan untuk menginduksi pertumbuhan tunas sehingga diperoleh tunas yang normal dan sehat. Akan tetapi dalam percobaan ini, belum diperoleh tunas yang tumbuh sehat. Oleh karena itu perlu diuji penggunaan konsentrasi ZPT dengan jenis dan konsentrasi yang berbeda, atau jenis ZPT alami seperti Zeatin (Wang *et al.* 2014).

Keempat genotipe yang dicoba memiliki respons yang berbeda, baik terhadap perlakuan kontrol maupun terhadap perlakuan *cryotherapy*. Genotipe ATTX98466-3R-WR memiliki kemampuan regenerasi tertinggi pada perlakuan kontrol dibandingkan tiga genotipe lainnya (frekuensi 7 pada skor 5), sedangkan genotipe UMTX383-3WRE/Y memiliki kemampuan

regenerasi terendah (frekuensi 6 pada skor 1). Keempat genotipe merupakan hasil persilangan dari tetua yang berbeda dan menyebabkan perbedaan dalam ketegaran tanaman.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode *cryotherapy* dengan teknik enkapsulasi-dehidrasi belum efektif untuk mendapatkan tunas *in vitro* kentang yang tetap hidup dan tumbuh baik setelah perlakuan dengan nitrogen cair, ditunjukkan oleh tidak adanya tunas yang mampu beregenerasi menjadi planlet setelah perlakuan, hanya pertumbuhan kalus. Tunas pada perlakuan kontrol (tanpa perendaman dalam nitrogen cair) menunjukkan skor daya hidup 5 dengan frekuensi 1–7, menunjukkan ujung tunas mampu beregenerasi menjadi planlet. Genotipe UMTX383-3WRE/Y sangat rentan terhadap perlakuan *cryotherapy* sehingga sebaiknya digunakan metode yang berbeda untuk mengeliminasi virus pada genotipe tersebut.

Teknik *cryotherapy* lain seperti enkapsulasi-vitrifikasi dan droplet-vitrifikasi dapat dicoba untuk mendapatkan tingkat daya hidup yang tinggi pada tunas kentang yang diberi perlakuan nitrogen cair. Zat pengatur tumbuh alami Zeatin sebaiknya ditambahkan pada media *recovery* untuk mendorong pertumbuhan tunas yang lebih cepat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Fulbright Scholarship yang telah memberi beasiswa kepada Ida Ayu Astarini melalui skim Fulbright Senior Research Program untuk melakukan riset di Horticulture Department, Texas A&M University, College Station, Texas, USA.

DAFTAR PUSTAKA

1. AlMaarri, K, Massa, R & AlBiski, F 2012, 'Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate potato Y potyvirus from infected potato plants', *Plant Biotech.*, vol. 29, pp. 237-43.
2. Feng, C, Wang, R, Li, J, Wang, B, Yin, Z, Cui, Z, Li, B, Bi, W, Zhang, Z, Li, M & Wang, Q 2013, 'Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of in vitro-grown shoot tips', in Lambardi, M, (ed.), *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York.
3. Fuller, BJ 2004, 'Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state', *CryoLetters*, vol. 25, pp. 375-88.

4. Jianming, B, Xiaoling, C, Xinxiong, L, Huachun, G, Xia, X & Zhie, Z 2012, 'Can cryopreservation eliminate the potato virus X (PVX) and potato spindle tuber viroid (PSTVd)', *Biosci. Methods*, vol. 3, no. 5, pp. 34-40.
5. Joris, H 2015, 'How to be successful with vitrification, vitrolife white paper', *Vitrolife*, Box 9080. SE-400 92 Goteborg. Sweden.
6. Kaczmarczyk, A, Rokka, VM & Keller, ERJ 2011, 'Potato shoot tip cryopreservation, a review', *Potato Res.*, vol. 54, pp. 45-79.
7. Kim, HH, Lee, JK, Hwang, HS & Engelmann, F 2007, 'Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique', *CryoLetters*, vol. 28, no. 6, pp. 471-82.
8. Murashige, T & Skoog, F 1962, 'A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures', *Phys. Plantarum*, vol. 15, pp. 473-9.
9. Wang, QC, Liu, Y, Xie, Y & You, M 2006, 'Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leaf roll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY)', *Potato Res.*, vol. 49, pp. 119-9.
10. Wang, QC & Valkonen, JPT 2008, 'Elimination of two viruses which interact synergistically from sweet potato by shoot tip culture and cryotherapy', *J. Virol. Methods*, vol. 154, pp. 135-45.
11. Wang, QC & Valkonen, JPT 2009, 'Improved recovery of cryotherapy-treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.)', *CryoLetters*, vol. 30, no. 3, pp. 171-82.
12. Wang, QC, Wang, R, Li, B & Cui, Z 2012, 'Cryopreservation: A strategy technique for safe preservation of genetically transformed plant materials', *Adv. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1-2.
13. Wang, B, Li, JW, Zhang, ZB, Wang, RR, Ma, YL, Blystad, DR, Keller, ERJ & Wang, QC 2014, 'Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants', *J. of Biotech.*, vol. 184, p. 47-55.
14. Yin, ZF, Bi, WL, Chen, L, Zhao, B, Volk, GM & Wang, QC 2014, 'An efficient, widely applicable cryopreservation of liliun shoot tips by droplet vitrification', *Acta. Physiol. Plant.*, vol. 36, pp. 1683-92.